

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA



FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di laurea specialistica in medicina e chirurgia

Dipartimento di Medicina Interna

TESI DI LAUREA

RUOLO DELL'OSSIDO NITRICO SUL RILASCIO
DELL'ATTIVATORE TISSUTALE DEL PLASMINOGENO
NEI SOGGETTI NORMOTESI E NEI PAZIENTI
IPERTESI

RELATORE: *Chiar.mo prof. STEFANO TADDEI*

CANDIDATO: *PUCCI MAIRI*

ANNO ACCADEMICO 2007/2008

INDICE	
RISSUNTO	Pag. 4
INTRODUZIONE: L'endotelio	Pag. 5
CAPITOLO 1 - LA FUNZIONE ENDOTELIALE -	
1.1) Ruolo dell'endotelio nella modulazione del tono vascolare	Pag. 6
1.2) Studio della funzione endoteliale nell'uomo	Pag. 10
-a) mediatori della funzione endoteliale	Pag. 14
- b) endotelio e ipertensione arteriosa	Pag. 16
1.3) Significato clinico della funzione endoteliale	Pag. 18
1.4) Ruolo dell'endotelio nella modulazione della fibrinolisi endogena	Pag. 21
CAPITOLO 2 – RILASCIO DEL t-PA -	
2.1) Rilascio endoteliale in acuto di t-PA: valutazione in vivo	Pag. 25
2.2) Rilascio regionale di t-PA	Pag. 25
-a) rilascio a livello dell'avambraccio	Pag. 25
- b) regolazione del rilascio di t-PA	Pag. 26

-c) rilevanza clinica del rilascio endoteliale di t-PA	Pag. 27
-d) concentrazioni plasmatiche basali di t-PA	Pag. 28
SCOPO DELLA TESI	Pag. 29
CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI -	
3.1) selezione dei pazienti	Pag. 30
3.2) disegno dello studio	
-a) procedure sperimentali	Pag. 30
-b) disegno sperimentale	Pag. 31
-c) analisi dei dati	Pag. 33
-d) farmaci	Pag. 34
Capitolo 4 - RISULTATI -	Pag. 34
Capitolo 5 - DISCUSSIONE-	Pag. 41
CONCLUSIONI	Pag. 43
BIBLIOGRAFIA	Pag. 44

RIASSUNTO

L'endotelio vascolare gioca un ruolo primario nella modulazione di molte importanti funzioni del sistema circolatorio inclusi il tono vascolare e la fibrinolisi. La principale sostanza implicata in queste funzioni è l'NO, prodotto dalle cellule endoteliali ad opera dell'enzima NO-sintetasi, dal catabolismo dell'L-arginina. In presenza dei maggiori fattori di rischio cardiovascolare, fra cui l'ipertensione, è dimostrata una ridotta produzione e secrezione di NO, che si ripercuote negativamente sulla vasomotricità e sulle proprietà antitrombotiche dell'endotelio. Scopo della presente tesi è di valutare il possibile ruolo dell'ossido nitrico nella modulazione del rilascio del fattore tissutale del plasminogeno (t-PA) nel microcircolo dell'avambraccio di soggetti normotesi e di pazienti ipertesi. Nei volontari sani e nei pazienti con ipertensione essenziale abbiamo studiato il rilascio locale di t-PA e le modificazioni del flusso a livello dell'avambraccio, mediante pletismografia strain-gauge, indotte dalla somministrazione intra-arteriosa di acetilcolina e di nitroprussiato di sodio, rispettivamente un agonista endotelio-dipendente ed endotelio indipendente. L'infusione di acetilcolina è stata anche ripetuta durante infusione intra-arteriosa dell'inibitore dell'NO sintetasi N-monometil-L-arginina. Nei soggetti normotesi, la risposta vasodilatante all'acetilcolina ha determinato un significativo incremento, dose dipendente, del rilascio di t-PA nell'avambraccio. In presenza di N-monometil-L-arginina, che ha significativamente ridotto l'effetto vasodilatante dell'acetilcolina, il rilascio di t-PA, sia basale che indotto da acetilcolina, è risultato ridotto.

Nei pazienti con ipertensione essenziale, la vasodilatazione mediata dall'acetilcolina, ridotta rispetto ai controlli, non ha determinato un significativo rilascio di t-PA. In questi pazienti, la N-monometil-L-arginina non ha modificato né la risposta vasodilatante dell'acetilcolina né il rilascio basale di t-PA, sia basale che indotto. I risultati di questa tesi dimostrano che sia la secrezione tonica di NO che quella indotta dall'agonista endoteliale giocano un ruolo diretto nel rilascio di t-PA da parte delle cellule endoteliali. Nei pazienti ipertesi essenziali, caratterizzati da una ridotta disponibilità di NO, vi è anche associata una ridotta capacità di rilascio di t-PA, suggerendo così l'importanza della disponibilità di NO, che, quando ridotta, compromette sia la capacità vasomotrice che il rilascio di t-PA.

INTRODUZIONE

Solo fino a pochi anni fa l'endotelio era considerato come una semplice barriera cellulare fra il sangue circolante e la parete vascolare muscolare e si riteneva che assolvesse esclusivamente a funzioni di trasporto, metaboliche, coagulative. Oggi sappiamo che la principale azione dell'endotelio si esplica a livello vascolare attraverso la produzione di varie sostanze che inducono rilasciamento e di altri fattori che causano invece vasocostrizione¹. E' inoltre ormai ben dimostrato che l'endotelio svolge anche un ruolo di primaria importanza non solo nella modulazione del tono vascolare, ma, più in generale, in tutti i processi che intervengono nella patogenesi

dell'aterotrombosi, grazie alle sue capacità di regolazione dell'aggregazione piastrinica, della proliferazione e della migrazione delle cellule muscolari lisce vascolari, dell'adesione e migrazione dei monociti nello spazio sub- endoteliale (mediante espressione di specifiche molecole di adesione come l'intercellular Adhesion Molecule 1 - ICAM1 - e la P selectina) e della produzione e attività biologica del suo più potente vasocostrittore endotelina ¹².

CAPITOLO 1 LA FUNZIONE ENDOTELIALE

1.1) *Ruolo dell'endotelio nella modulazione del tono vascolare*

-SOSTANZE VASODILATANTI- L'endotelio è un organo autocrino-paracrino che controlla il tono vascolare attraverso la produzione di numerosi fattori vasoattivi. Tra essi la principale sostanza vasodilatante responsabile del rilascio endotelio-dipendente, inizialmente denominata EDRF (Endothelium derived relaxing factor), è stata identificata con il monossido di azoto, comunemente indicato come nitrossido (NO)^{3,4}. L'NO è un gas libero solubile che viene prodotto dalla conversione dell'aminoacido L-arginina in citrullina ad opera di un'enzima calciomodulina dipendente situato nel citosol, denominato NO sintetasi (NOS)⁵. Di quest'ultimo si conoscono tre isoforme: endoteliale (eNOS), inducibile (iNOS), e neuronale (nNOS). La eNOS e la nNOS sono espresse costitutivamente nelle cellule e la loro attività è Ca-calmodulina-dipendente. Al contrario, la iNOS è principalmente espressa in corso di infiammazione, (infatti si trova nei macrofagi

attivati da citochine quali INF γ o altri agenti) e la sua attività non necessita del complesso Ca-calmodulina. La biosintesi di NO richiede l'attivazione della NOS in presenza di alcuni cofattori tra cui la nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH), la flavina mononucleotide (FMN), la flavina adenina dinucleotide (FAD), la tetraidrobiopterina (BH₄) e l'eme. La biodisponibilità di BH₄ è essenziale per l'attività catalitica della NOS. L'NO, dotato di una breve emivita, diffonde rapidamente dall'endotelio alle sottostanti cellule muscolari lisce (VSMCs), determinando a tale livello l'attivazione dell'enzima guanilciclasi solubile e il conseguente incremento di 3'-5' guanosin monofostato ciclico (GMPc). Questo induce, attraverso l'attivazione di una serie di chinasi, la riduzione della concentrazione citosolica di calcio nelle cellule muscolari lisce, con conseguente loro rilascio e quindi vasodilatazione⁶. Oltre agli effetti di modulazione del tono vascolare, l'NO determina numerosi altri effetti che possono essere considerati protettivi dell'aterosclerosi; previene l'adesione dei leucociti e la loro migrazione nel compartimento vascolare, l'aggregazione piastrinica, la proliferazione delle VSMCs, l'espressione di molecole di adesione da parte dell'endotelio e quindi l'adesione ad esso dei monociti⁷⁻¹¹. La produzione di NO da parte della eNOS avviene in risposta a diverse sostanze stimolanti che agiscono su recettori specifici, quali acetilcolina, bradichinina e sostanza P, serotonina, citochine come l'interleuchina 1 (IL1) e il Tumor necrosis factor (TNF) oltre che da forze meccaniche, come lo shear stress durante l'aumento del flusso sanguigno (Figura 1). L'attività della NOS può essere bloccata sperimentalmente da sostanze analoghe della L-arginina, come la N-monometil-L arginina (L-NMMA)¹², oppure dalla produzione endogena di sostanze simili quali la N-dimetil-L-arginina

asimmetrica¹³. Oltre all'NO, un altro fattore in grado di determinare rilascio della parete vascolare è la prostaciclina (PGI₂), prodotto principale della cicloossigenasi endoteliale che, fra le numerose funzioni, assolve anche a quella di inibizione dell'attivazione piastrinica. La cicloossigenasi attiva l'adenilciclasi, che a sua volta determina un aumento dei livelli di AMPc con conseguente fosforilazione della miosinchinasi e ridotta formazione del complesso acto-miosinico necessario per la contrazione delle cellule muscolari lisce. La prostaciclina, la cui emivita plasmatica nell'uomo varia fra i 3 e i 5 minuti, è rapidamente metabolizzata a 6-ketoprostaglandina 1 α , priva di attività biologica¹⁴. La sua produzione è stimolata dalla trombina, dalla bradichinina, dallo shear stress, dall'ADP e da citochine liberate dall'adesione dei leucociti all'endotelio¹⁵.

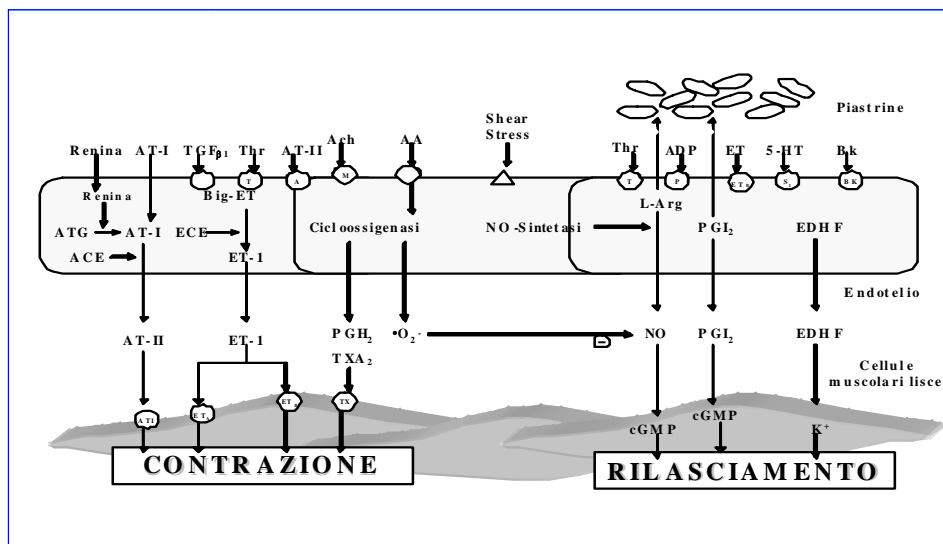


Figura 1

Fattori endoteliali: i principali fattori ad azione vasodilatatrice prodotti dalle cellule endoteliali sono l'ossido nitrico (NO) e il fattore iperpolarizzante derivante dall'endotelio (EDHF). NO è prodotto all'interno delle cellule dall'NO sintetasi a partire dall'L-arginina in risposta a diversi agonisti endoteliali, come acetilcolina, bradichinina, sostanza P, che agiscono su recettori specifici, o a forze meccaniche, come lo shear stress.

Infine, le cellule endoteliali producono un altro fattore capace di indurre vasodilatazione, denominato EDHF, che causa iperpolarizzazione delle cellule muscolari lisce, e che i più recenti lavori identificano o con l'acido epossieicosaitrienoico o col perossido di idrogeno, anche se le alternative non sono ancora da escludere. In diversi modelli sperimentali e in alcune condizioni cliniche, l'aumento di EDHF induce vasodilatazione come rapido meccanismo compensatorio in condizioni di ridotta disponibilità di NO^{16,17}. Ad oggi tale fattore, che sembra includere l'azione di numerose sostanze ad effetto iperpolarizzante, è oggetto di numerosi studi per verificarne ulteriori probabili effetti biologici oltre a quello vasodilatante.

-SOSTANZE VASOCOSTRITTICI- L'endotelio è in grado di produrre anche sostanze che determinano vasocostrizione. In condizioni fisiologiche infatti, le cellule endoteliali producono endotelina (ET), un peptide costituito da 21 aminoacidi, che rappresenta uno dei più potenti vasocostrittori biologici (circa dieci volte più potente dell'angiotensina II). L'ET è conosciuta in tre diverse isoforme, l'ET1, 2, 3 delle quali solo la prima è prodotta dalle cellule endoteliali (oltre che dalle cellule muscolari lisce). Le azioni dell'ET1 sono mediate da due recettori denominati ETA ed ETB; nonostante il loro effetto sia principalmente di vasocostrizione, gli ETB endoteliali determinano vasodilatazione in quanto inducono la produzione di NO e quindi vasorilassamento (questo spiega come l'infusione di ET1 esogena possa provocare vasodilatazione seguita da una profonda vasocostrizione)¹. Infine, in numerose condizioni patologiche quali l'invecchiamento, l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito, l'ipercolesterolemia, l'aterosclerosi, gli

stessi mediatori (acetilcolina etc.) che determinano la sintesi di NO determinano parallelamente la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (cioè causano stress ossidativo)¹⁸. Queste sostanze possono indurre contrazione, ma soprattutto sono potenti distruttori del NO stesso, essendo quindi la causa principale di disfunzione endoteliale. Numerosi sistemi enzimatici sono chiamati in causa nell'attivare la produzione di stress ossidativo. Tra essi, giocano un ruolo principale la ciclossigenasi, la NADPH ossidasi e la xantino-ossidasi¹⁹. In numerosi modelli sperimentali di ipertensione arteriosa e nell'uomo è stato dimostrato che l'attivazione della cicloossigenasi endoteliale può determinare sia la produzione di endoperossidi vasocostrittori quali il trombossano A-2 e la prostaglandina H-2 che di radicali liberi dell'ossigeno²⁰. E' importante ricordare che mentre gli endoperossidi vengono prodotti parallelamente al NO e svolgono il loro effetto indipendentemente da quest'ultimo (realizzando un antagonismo funzionale: vasocostrizione vs vasodilatazione), i radicali liberi dell'ossigeno agiscono attraverso la distruzione dell'NO stesso.

1.2) Lo studio della funzione endoteliale nell'uomo

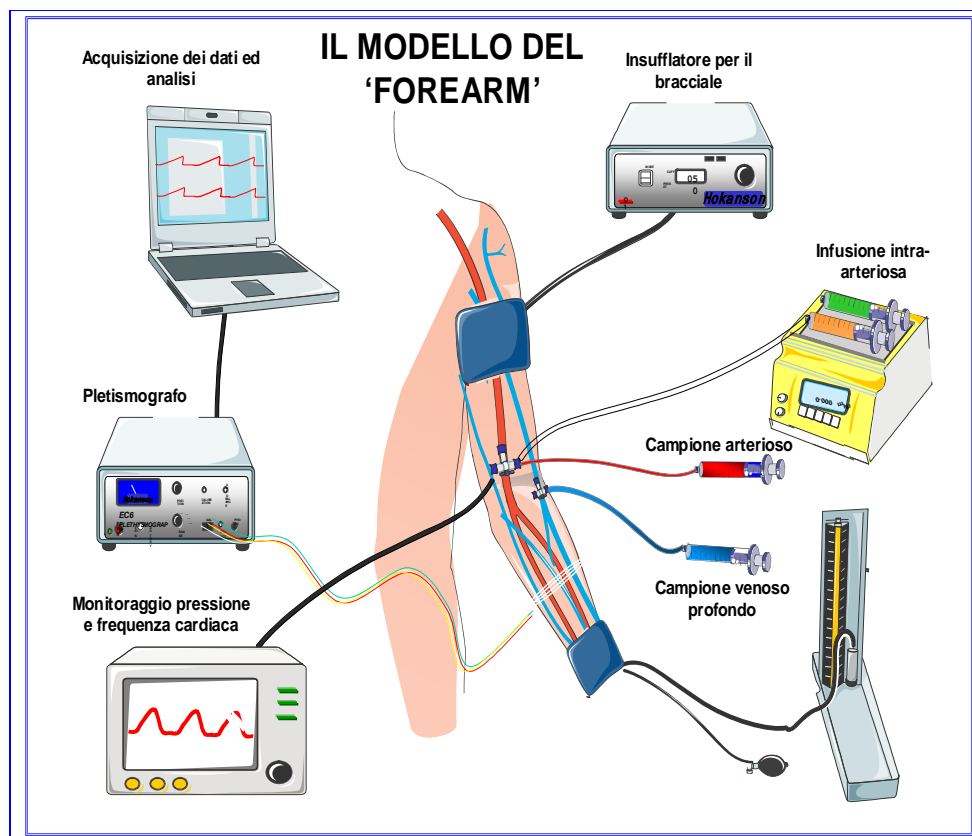
Nell'uomo il metodo più sensibile e riproducibile per studiare la funzione endoteliale e la disponibilità di NO è rappresentato dagli studi di reattività vascolare. Tali studi vengono eseguiti a livello di distretti vascolari funzionalmente isolati dai meccanismi di regolazione del circolo sistemico, valutando le risposte endotelio-dipendenti ad agonisti e antagonisti endoteliali. In questo modo si riesce ad esplorare l'effettiva funzionalità del distretto vascolare esaminato. L'utilizzo di tali metodiche permette di paragonare l'entità della risposta ad agonisti endotelio-dipendenti (shear stress, acetilcolina, bradichinina, sostanza

P, serotonina etc...) con la risposta a vasodilatatori endotelio-indipendenti, quali i nitrati (che hanno un'azione diretta sulle cellule muscolari vasali), al fine di escludere che eventuali differenze siano in realtà causate da un'alterata risposta contrattile delle cellule muscolari lisce²¹. La funzione endoteliale può essere studiata sia a livello coronarico che periferico, e sia nei vasi di conduttanza (arterie epicardiche, radiale, omerale, femorale) che nel microcircolo. Lo studio coronarico richiede l'infusione diretta di sostanze agoniste in un'arteria epicardica durante coronarografia, seguita da valutazione quantitativa con tecnica angiografica. Associando una misurazione della velocità del flusso mediante catetere doppler è possibile determinare le variazioni del tono vascolare anche nel microcircolo coronarico²¹. A causa della sua invasività questa metodica però è poco utilizzata anche se i dati ottenuti hanno certamente un elevato valore prognostico. Per lo studio della funzione endoteliale del macrocircolo periferico la tecnica maggiormente utilizzata è quella non invasiva della "flow mediated dilation" (FMD) che consiste nell'analizzare la risposta vasomotoria di una grande arteria, in seguito all'aumento di flusso post-ischemico, impiegando un ecografo ad alta risoluzione²¹. In questo modo le variazioni di calibro indotte dallo "shear stress" rappresentano la risposta endotelio dipendente. In genere questa tecnica viene applicata soprattutto sull'arteria brachiale od omerale; ha il vantaggio di non essere invasiva e di poter trovare applicazione nell'identificazione precoce dei pazienti che non sono eleggibili per la terapia farmacologica per le correnti linee guida, ma che sono ad aumentato rischio di eventi cardiovascolari. Questa tecnica necessita di notevole accuratezza nell'esecuzione ed ha poco potere di discriminazione, richiedendo un elevato numero di pazienti per

l'ottenimento di risultati validi. La FMD può essere eseguita anche sui vasi coronarici, seppur con tecnica invasiva, infondendo papaverina in un segmento distale di un'arteria epicardica; questo farmaco riduce le resistenze del microcircolo con conseguente aumento di flusso. Ad oggi però, l'approccio sperimentale più utilizzato nell'uomo per lo studio della funzione endoteliale è quello dell'avambraccio isolato, principale modello utilizzato per il microcircolo periferico e di riferimento per il nostro studio^{21,22}(figura 2). Attraverso l'incanulazione dell'arteria brachiale vengono infusi agonisti e antagonisti endotelio dipendenti con velocità tali da determinare concentrazioni plasmatiche locali molto elevate, che risultano però totalmente inefficaci a livello sistemico, per la diluizione nel torrente circolatorio. In questo modo non si modifica la pressione di perfusione del distretto vascolare dell'avambraccio e pertanto gli eventuali incrementi o decrementi di flusso arterioso che osserviamo a questo livello (Forearm blood flow FBF) e misurati con pletismografia venosa "strain gauge", sono indice di vasodilatazione o vasocostrizione locale²³⁻²⁵. In concomitanza all'accesso arterioso, indispensabile per la somministrazione dei farmaci e per il monitoraggio della pressione intraarteriosa e della frequenza cardiaca battito-battito, si esegue anche una cannulazione della vena profonda ipsilaterale per l'esecuzione di prelievi ematici che, contestualmente al prelievo arterioso, consentono di calcolare la concentrazione di sostanze desiderate e di determinarne l'eventuale produzione locale, in conseguenza dello stimolo applicato²⁶. Questo modello si è imposto nell'ambito degli studi di reattività vascolare perché offre sicuri vantaggi: anzitutto un'elevata riproducibilità (è opportuno prestare attenzione alla temperatura della stanza in cui si esegue lo studio che deve essere standard e il paziente deve rimanere

il più possibile rilassato, soprattutto durante le acquisizioni dei dati, di modo che i risultati non siano inficiati dalla contrazione della muscolatura); in secondo luogo la possibilità di sperimentare numerosi agonisti e antagonisti per studiare gli effettivi meccanismi alla base della vasodilatazione endotelio dipendente, e infine la possibilità di ottenere un ampio range di vasodilatazione, un effetto quest'ultimo che consente di ottenere differenze statisticamente significative tra popolazioni differenti, con un numero relativamente basso di pazienti.

Figura 2



Lo schema illustra il modello sperimentale dell'avambraccio isolato e perfuso, tra i più utilizzati per lo studio della funzione endoteliale nell'uomo. La cannulazione dell'arteria brachiale consente l'infusione di agonisti e antagonisti direttamente in arteria, in modo da avere elevate concentrazioni locali senza effetti emodinamici sistemici. In questo modo, ogni aumento o diminuzione di flusso (misurati con pletismografia strain gauge) sono indice rispettivamente di vasodilatazione o vasocostrizione locale. Il simultaneo campionamento artero-venoso ci permette poi di calcolare l'eventuale produzione o up-take 'locale' di determinate sostanze.

D'altro canto però ha lo svantaggio di essere moderatamente invasiva, di lunga durata (per standardizzare le acquisizioni e renderle più affidabili possibile è necessario seguire dei protocolli che impongono l'infusione delle sostanze testate per alcuni minuti e l'attesa successiva di altrettanti minuti per permettere il wash-out del farmaco, onde evitare che ogni singola infusione possa influire e modificare l'acquisizione successiva). Ricordiamo infine che la funzione endoteliale può essere studiata anche mediante stimoli come il 'cold pressor test' o 'l'esercizio dinamico', cosiddetti 'misti' in quanto attivano l'endotelio sia attraverso l'aumento di flusso (provocando quindi una FMD) sia attraverso una stimolazione recettoriale endogena (in genere gli α_2 stimolati dall'attività simpatica)²⁷. In ogni caso la maggior parte degli studi presenti in letteratura valuta la funzione endoteliale utilizzando uno stimolo farmacologico, rappresentato soprattutto dall'acetilcolina. Questa metodica ha infatti ottenuto numerose validazioni sperimentali e cliniche, riuscendo ad individuare correlazioni significative fra l'alterata funzione endoteliale e le modificazioni vascolari di tipo aterosclerotico.

1.2.a) Mediatori della funzione endoteliale nell'uomo

Il ruolo cruciale dell'NO nella regolazione della funzione vascolare può essere apprezzato valutando la risposta dei vasi alla somministrazione intra-arteriosa di alcune sostanze quali la N-monometil-L-arginina (L-NMMA), un antagonista competitivo dell'enzima NO sintetasi²⁸, la quale nel soggetto sano induce una vasocostrizione dose-dipendente. Ciò dimostra come nell'uomo l'NO venga tonicamente prodotto dalle

cellule endoteliali e partecipi alla fisiologica regolazione del tono vascolare. Per quanto riguarda invece l'attivazione endoteliale mediata da agonisti, l'infusione di acetilcolina nell'arteria brachiale determina una vasodilatazione dose-dipendente. Se in soggetti normotesi tale infusione viene ripetuta in presenza di L-NMMA, si ottiene una riduzione dell'effetto vasodilatante dell'acetilcolina. Aumentando la concentrazione di L-NMMA si arriva ad ottenere una pressoché totale abolizione del suo effetto vasodilatante. Questo dimostra, che nei soggetti sani, l'attivazione recettoriale delle cellule endoteliali attraverso l'acetilcolina porta al rilascio delle cellule lisce vascolari attraverso la produzione di NO²¹. Al fine di valutare se nell'uomo l'NO sia o meno l'unico mediatore di origine endoteliale a determinare vasodilatazione, in soggetti normotesi è stata infusa acetilcolina in condizioni basali e quindi ripetuta in presenza di indometacina, noto inibitore della ciclo ossigenasi²⁵, oppure di ouabaina, un antagonista della pompa Na⁺/K⁺ ATPasi¹⁶. L'indometacina consente di valutare un'eventuale produzione di prostaciclina (PGI₂), mentre l'ouabaina di fattore iperpolarizzante, EDHF. Si è visto che nessuna delle due sostanze ha modificato la risposta all'acetilcolina; questo consente di escludere, in condizioni fisiologiche la partecipazione della PGI₂ o di EDHF alla vasodilatazione endotelio dipendente. Infine nell'ipotesi che l'acetilcolina potesse determinare una vasodilatazione attraverso l'inibizione presinaptica del rilascio di noradrenalina, è stata eseguita una co-infusione di acetilcolina e fentolamina, un antagonista non selettivo dei recettori α adrenergici; anche in questo caso non si è dimostrata nessuna modificazione alla risposta vasodilatante dell'acetilcolina. Tutti questi dati pertanto, indicano, che in condizioni

fisiologiche nell'uomo, il principale mediatore della vasodilatazione endotelio dipendente stimolata da agonisti recettoriali, è l'NO. Il suo ruolo cruciale nella regolazione della funzione vascolare è determinato anche dalla sua interazione con altre sostanze vasoattive.

1.2.b) Endotelio e ipertensione arteriosa

Numerosi dati sperimentali indicano che l'ipertensione arteriosa è caratterizzata da una ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente²⁹. Nell'uomo, tale riduzione è stata ampiamente documentata nel microcircolo dell'avambraccio dei pazienti con ipertensione arteriosa essenziale, utilizzando soprattutto l'acetilcolina, ma anche la metacolina, la bradichinina e la sostanza P^{16,25,30-32}. Tale alterazione è stata riscontrata anche nelle arteriole del circolo cutaneo e sottocutaneo, nel circolo renale e nel macro- e microcircolo coronarico di pazienti con ipertensione arteriosa essenziale²². Per quanto riguarda i meccanismi responsabili, è stato osservato che la L-NMMA, mentre è in grado di ridurre l'effetto vasodilatante dell'acetilcolina nei soggetti normotesi, è inefficace nei pazienti ipertesi²². Questo dato indica che nell'ipertensione essenziale è presente una ridotta biodisponibilità di NO. Inoltre, nei pazienti ipertesi essenziali, ma non nei soggetti sani, l'infusione intra-brachiale di indometacina, un noto inibitore della ciclo-ossigenasi, migliora la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina, come pure l'effetto di inibizione della L-NMMA sulla vasodilatazione mediata dall'agonista muscarinico²⁰. Questo risultato ha consentito di dimostrare che la disfunzione endoteliale caratteristica dell'ipertensione arteriosa essenziale sia mediata anche da fattori vasocostrittori di origine endoteliale ciclo-ossigenasi dipendenti (EDCFs). Poiché bloccando la ciclo-ossigenasi sembra ripristinarsi la

biodisponibilità di NO, è stato suggerito che l'attività di questo enzima potesse determinare la produzione di sostanze capaci anche di inattivare l'NO. Gli studi sperimentali presenti in letteratura suggeriscono che tali mediatori siano i radicali liberi dell'ossigeno, in particolar modo l'anione superossido³³. Alcuni anni fa nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che nel paziente iperteso essenziale l'infusione in arteria brachiale di vitamina C, una sostanza antiossidante, induce un aumento della vasodilatazione indotta dall'acetilcolina ed il ripristino dell'effetto inibitorio della L-NMMA sulla risposta vascolare all'agonista muscarinico. Al contrario, la vitamina C non altera l'effetto vasodilatante del nitroprussiato di sodio, un vasodilatatore endotelio-indipendente²⁵. Tutto ciò indica che nei pazienti ipertesi essenziali la disfunzione endoteliale è causata da una ridotta biodisponibilità di NO, secondaria allo stress ossidativo. In queste condizioni altri mediatori assumono importanza nel determinare l'effetto vasodilatante. I dati a disposizione suffragano l'ipotesi che il fattore endoteliale che causa l'iperpolarizzazione delle cellule muscolari lisce, l'EDHF (fattore iperpolarizzante di origine endoteliale), prodotto dal citocromo p450 2C9 (CYP 2C9), agisca come un meccanismo di compenso alla ridotta disponibilità di NO per sostenere la vasodilatazione endotelio-dipendente. In pazienti ipertesi abbiamo dimostrato che la risposta all'acetilcolina e maggiormente alla bradichinina, vengono antagonizzate dal sulfafenazolo, un inibitore selettivo del CYP 2C9¹⁷. Interessante è poi il dato che, sempre in questi pazienti, l'inibizione dello stress ossidativo con la vitamina C, non solo potenzia la risposta all'agonista endoteliale, ma ripristina anche la capacità inibente dell'L-NMMA, annullando quella del sulfafenazolo. In accordo con quanto descritto negli animali da

esperimento, nel paziente iperteso l'EDHF si comporta come meccanismo di compenso parziale per sostenere la vasodilatazione endotelio dipendente, in particolare la risposta mediata dalla bradichinina, quando la biodisponibilità di NO è ridotta a causa dello stress ossidativo.

1.3) *Significato clinico della disfunzione endoteliale*

Abbiamo visto precedentemente come la disfunzione endoteliale sia un' alterazione primitiva che si associa strettamente all' ipertensione arteriosa, ma non è direttamente correlata agli elevati valori pressori³⁴. Questo dato è in accordo con il fatto che la disfunzione endoteliale non è un' alterazione esclusiva dell' ipertensione arteriosa. Infatti la presenza di disfunzione endoteliale legata ad una ridotta biodisponibilità di NO secondaria ad una aumentata produzione di stress ossidativo è stata dimostrata nella maggior parte dei fattori di rischio cardiovascolare quali l' invecchiamento, la menopausa, il fumo di sigaretta, l' ipercolesterolemia, il diabete mellito, l' iperomocisteinemia, oltre ovviamente all' ipertensione arteriosa²². Inoltre la disfunzione endoteliale è presente anche nell' aterosclerosi coronarica e la simultanea presenza di più fattori di rischio cardiovascolare, determina una ulteriore riduzione della vasodilatazione endotelio-dipendente. Quindi, l' insieme di queste evidenze suggerisce una stretta associazione tra disfunzione endoteliale e rischio cardiovascolare. Questa ipotesi è in pieno accordo con la letteratura sperimentale che indica la disfunzione endoteliale come marker predittivo di eventi vascolari. Qual'è quindi il rapporto tra disfunzione endoteliale e rischio cardiovascolare? Come già anticipato

nell' introduzione, l' NO non è solo un potente vasodilatatore, ma determina anche inibizione dell' aggregazione piastrinica, della proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce, dell' adesione dei monociti, dell' espressione delle molecole di adesione e della sintesi di ET-1. Al contrario, in presenza di disfunzione endoteliale causata da stress ossidativo si ha distruzione di NO e conseguente vasocostrizione, facilitazione dell' aggregazione piastrinica, della proliferazione delle cellule muscolari lisce, dell' adesione dei monociti e aumento della sintesi di ET-1. Pertanto è intuitivo che un endotelio funzionante protegga il vaso dallo sviluppo di aterosclerosi e trombosi, mentre un endotelio che non funziona, non solo perde la sua efficacia protettiva, ma diviene esso stesso induttore di quei meccanismi patogenetici che favoriscono lo sviluppo di aterosclerosi³⁵. Quindi la disfunzione endoteliale sembra essere il meccanismo patogenetico precoce che in presenza dei vari fattori di rischio cardiovascolari favorisce lo sviluppo delle lesioni aterotrombotiche. Inoltre, la vasodilatazione endotelio-dipendente può contribuire alla genesi degli eventi cardiovascolari modulando la stabilità di placca e il vasospasmo coronarico e riducendo la riserva coronarica. La disfunzione endoteliale è perciò una condizione che modifica profondamente la struttura e la funzione vascolare, determinando alterazioni della vasomotricità e promozione dell'aterosclerosi e della trombosi, contribuendo così agli eventi cardiovascolari³⁶. Questa affermazione è sempre più supportata da evidenze che dimostrano l'associazione fra disfunzione endoteliale ed i marker di danno vascolare oltre che eventi cardiovascolari, sia in pazienti con ipertensione essenziale, sia, più in generale, in pazienti con malattia aterosclerotica. Nel nostro laboratorio abbiamo osservato che negli ipertesi essenziali, l'alterata risposta

all'acetilcolina nel microcircolo dell'avambraccio è correlata con l'ispessimento medio-intimale delle carotidi, indice precoce di aterosclerosi³⁷. Inoltre, nelle arterie epicardiche di soggetti normotesi la risposta all'acetilcolina mostra una correlazione inversa con la placca intramurale valutata con tecnica doppler intravascolare³⁸. E' da notare che la disfunzione endoteliale è stata associata all'incidenza di eventi cardiovascolari in numerosi studi longitudinali. Suwaidi et al hanno valutato l'outcome dei pazienti con malattia coronarica lieve sulla base della disfunzione endoteliale. Solo i pazienti con grave compromissione della funzione endoteliale (valutata come risposta del microcircolo coronarico all'acetilcolina) hanno presentato eventi cardiovascolari in un follow up medio di 28 mesi³⁹. Risultati simili sono stati ottenuti da Schachinger et al, che hanno confermato, in pazienti con malattia cardiovascolare che gli eventi maggiori avevano un'associazione significativa con la disfunzione endoteliale coronarica, valutata come risposta all'infusione intracoronarica di acetilcolina, all'attivazione simpatica con il 'cold pressor test' e con la FMD indotta dall'infusione distale di papaverina⁴⁰. Heitzer et al hanno dimostrato che nel microcircolo dell'avambraccio di 281 pazienti con malattia coronarica, in un follow up di 4.5 anni, il grado di vasodilatazione all'acetilcolina e dell'effetto facilitante della vitamina C su tale risposta, sono risultati fattori predittivi indipendenti di eventi cardiovascolari⁴¹. Recentemente è stata dimostrata anche la rilevanza della disfunzione endoteliale sugli eventi cerebrovascolari, ed è stato inoltre posto l'accento su un altro aspetto della disfunzione endoteliale, quello della riduzione della capacità fibrinolitica nelle cellule dell'endotelio, misurata come rilascio di t-PA^{42,43}. E' comunque necessario sottolineare che tutti questi studi indicano l'importanza della disfunzione endoteliale nei soli

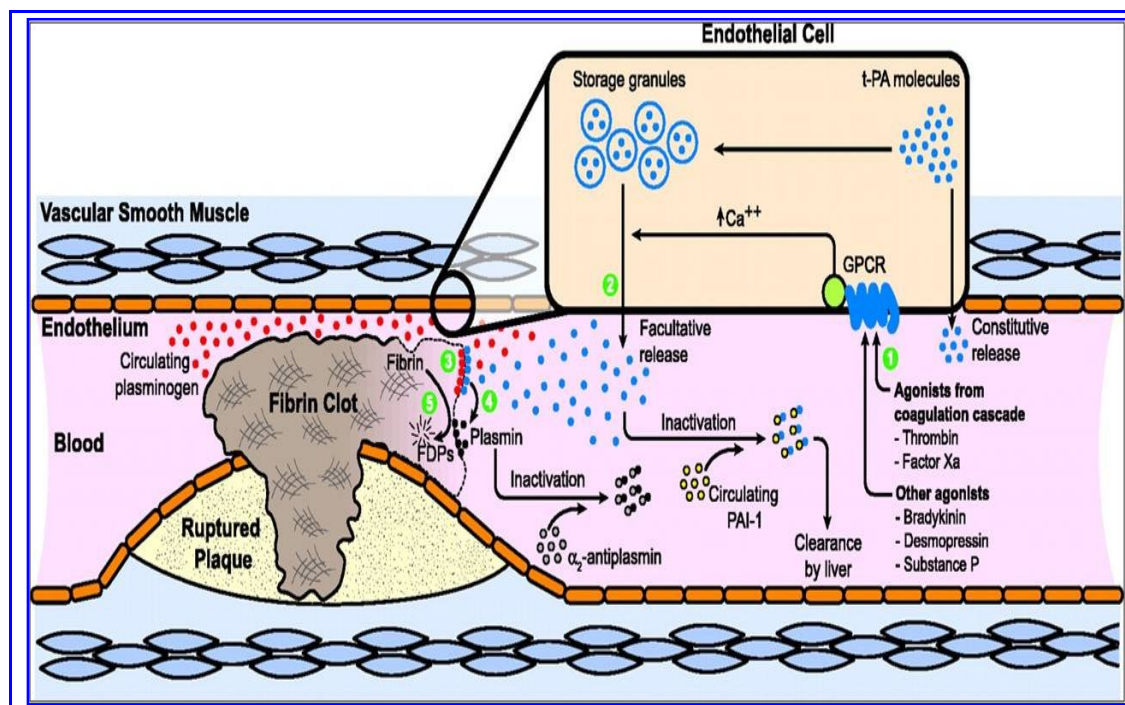
pazienti ad alto rischio cardiovascolare. L'unico lavoro che ha valutato il significato prognostico della vasodilatazione endotelio-dipendente ha osservato che la risposta all'acetilcolina nel microcircolo dell'avambraccio può predire gli eventi cardiovascolari nei pazienti ipertesi essenziali⁴⁴. Tuttavia questo studio presenta un problema metodologico che ha portato a rilevare un numero di eventi estremamente elevato rispetto all'atteso in questo tipo di popolazione. Pertanto, al momento attuale sono ancora necessari ulteriori studi che valutino l'impatto prognostico della disfunzione endoteliale in pazienti a basso rischio cardiovascolare.

1.4) Ruolo dell'endotelio nella modulazione della fibrinolisi endogena.

Nel soggetto sano l'endotelio previene la formazione di trombi attraverso numerosi meccanismi⁴². Trombomodulina, proteina S, eparan-solfato, proteoglicani e inibitore del fattore tissutale sono tutti inibitori della coagulazione di origine endoteliale, mentre prostaciclina, NO e Cd-39 inibiscono l'aggregazione piastrinica. Comunque, quando la funzione endoteliale è alterata, per esempio in presenza di danno o infiammazione, l'endotelio può rapidamente invertire le sue funzioni in senso pro-coagulante mediante down-regulation dei fattori anticoagulanti, inducendo l'espressione del fattore tissutale e incrementando la secrezione di sostanze quali la fibronectina, il fattore di von Willebrand e il fattore attivante le piastrine³. Un aspetto cruciale della funzione endoteliale riguarda il rilascio acuto di t-PA poiché la conseguente attivazione del sistema fibrinolitico endogeno protegge la circolazione dall'inappropriata deposizione di fibrina intravascolare e

dalla trombosi. Dopo la formazione del trombo, l'endotelio rilascia acutamente t-PA in risposta a un serie di fattori connessi alla cascata coagulativa, in particolare al fattore X attivato (Xa) e alla trombina⁴⁵. Una volta secreto, il t-PA catalizza la conversione del plasminogeno circolante nella sua forma attiva plasmina, facilitando la dissoluzione del trombo attraverso la proteolisi della fibrina a prodotti di degradazione della fibrina solubili. (Figura 3). La conversione del plasminogeno a plasmina mediata da t-PA sulla superficie endoteliale è altamente stimolata in presenza di fibrina⁴⁶, assicurando in questo modo, un'efficace azione localizzata⁴⁷. Poiché il plasminogeno è presente in grande eccesso sul t-PA plasmatico, l'attivazione e l'efficacia della fibrinolisi sono principalmente determinate da un rapido e notevole rilascio di t-PA. La concentrazione di t-PA nel plasma umano è compreso fra 3 e 10 ng/mL, ma solo una porzione relativamente piccola è funzionalmente attiva a causa della presenza di inibitori delle serino proteasi (serpine), principalmente, l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI) tipo 1 (PAI-1), ma anche PAI-2, PAI-3, macroglobulina a2 e l'inibitore dell'esterasi C1. La porzione di t-PA attivo varia in modo inversamente proporzionale alla concentrazione plasmatica di PAI-1, compresa fra il 2% e il 33%⁴⁸. La vita media del t-PA plasmatico è di circa cinque minuti, e il fegato costituisce il maggior sito di clearance⁴⁹. L'interazione fra il t-PA e il PAI-1 ha una costante di secondo ordine di $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, e c'è un eccesso di ordine modale del PAI sul t-PA nel plasma⁵⁰. Di conseguenza, perché il t-PA attivo non legato possa agire a livello del trombo, è indispensabile un rilascio locale, anche perché la fibrinolisi si è dimostrata più efficace se il t-PA è incorporato durante, piuttosto che dopo, la formazione del trombo⁵¹.

Figura 3



La risposta fibrinolitica endoteliale alla trombosi endoluminale: agonisti originati dalla cascata coagulativa agiscono su recettori della superficie delle cellule endoteliali accoppiati a proteine, stimolando il rilascio dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) dai granuli di stoccaggio, uno step che richiede un incremento della concentrazione intracellulare di calcio (Ca^{5+}). Il t-PA libero agisce sul plasminogeno legato al trombo producendo plasmina, che a sua volta, degrada il reticolo di fibrina in prodotti di degradazione della fibrina, dissolvendo il trombo. Il processo fibrinolitico è inibito dall'inattivazione del t-PA da parte dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1 (PAI-1), e dalla plasmina da parte dell' α_2 antiplasmina. (From Oliver et al. ATVB 2005;25:2470-2479)

Il t-PA è una serino proteasi di 530 aminoacidi del peso di 68 Kda, codificata da un gene posizionato sul cromosoma 8 e generata principalmente a livello dall'endotelio. Le cellule che lo costituiscono osservate in cultura sintetizzano e rilasciano costitutivamente t-PA⁵², il quale viene rilasciato da granuli di secrezione in seguito a numerosi stimoli. Alcuni autori hanno suggerito che il t-PA sarebbe stoccato assieme al vWF nei corpi di Weibel-Palade⁵³, anche se più recenti studi hanno dimostrato in modo convincente che il t-PA è stoccato in

vescicole separate⁵⁴; tutto ciò è in perfetta linea con i risultati delle osservazioni in vivo, dalle quali è emerso che le sostanze in grado di stimolare il rilascio di t-PA non rilasciano allo stesso tempo il vWF^{55,56}. Il processo di trasduzione del segnale che regola lo stimolo secretorio non è ancora stato ben definito, anche se, le proteine G e l'incremento del calcio intracellulare sembrano rivestire un ruolo rilevante⁵⁷. La sintesi endoteliale del t-PA varia con il diametro dei vasi e la localizzazione anatomica. Nell'uomo, t-PA immunoreattivo è presente nell'endotelio normale delle arterie coronariche e mammarie interne, nell'aorta e nelle vene safene. Il suo rilascio però è diverso anche nei diversi distretti: negli arti superiori per esempio, ne viene rilasciata una quantità maggiore rispetto agli arti inferiori. La capacità dell'endotelio di stoccare e rilasciare tale fattore può essere stimolata per molte ore senza portare a manifestazioni di tachifilassi⁵⁸, ed è stato osservato che l'avambraccio può rilasciarne fino a 4.5 µg/min⁵⁹, concentrazione plasmatica locale sufficiente per raggiungere quella necessaria durante la trombolisi terapeutica sistemica.

CAPITOLO 2 RILASCIO DEL t-PA

2.1) Rilascio endoteliale in acuto di t-PA: valutazione in vivo

Nell'uomo, il rilascio acuto di t-PA può essere stimato a livello sistemico, per esempio dopo infusione endovenosa di desmopressina o bradichinina^{60,61}. Comunque questo approccio è limitato da effetti potenzialmente confondenti, quali ad esempio le modificazioni

emodinamiche nel circolo sistemico, le clearance del t-PA e del PAI-1, l'attivazione del sistema nervoso simpatico e il concomitante rilascio di altri mediatori. Una valutazione diretta della capacità di rilascio di t-PA in acuto a livello locale, cioè all'interno del letto vascolare studiato, evita questi problemi, ed è probabilmente un marker più rappresentativo di difesa contro la trombosi arteriosa. La disponibilità locale di t-PA attivo dipende dall'entità del rilascio in loco piuttosto che dall'ammontare di t-PA o di PAI-1 che ritroviamo nei tessuti trasportati dal sangue arterioso⁶².

2.2) Rilascio regionale di t-PA

Il rilascio acuto di t-PA è stato valutato nella circolazione coronarica e in quella dell'avambraccio dell'uomo usando diverse sostanze, conosciute come agonisti, inclusi la bradichinina, sostanza P, desmopressina e metacolina.

2.2.a) Rilascio a livello dell'avambraccio

La metodologia usata per valutare il rilascio di t-PA nell'avambraccio in risposta all'infusione intrabrachiale è basata sulle differenti concentrazioni plasmatiche di t-PA fra il circolo arterioso afferente ed il circolo venoso di efflusso nel singolo braccio^{63,64}. Questa tecnica richiede l'infusione di farmaci attraverso catetere intraarterioso e il gradiente arterovenoso è calcolato da campioni di sangue prelevati simultaneamente da questo catetere e da quello venoso ipsilaterale. L'entità del circolo nell'avambraccio è misurato come flusso plasmatico (FBF), misurato mediante tecnica pletismografica a strain gauge, e

correggendo l'ematocrito arterioso per l'1% di plasma trattenuto. Il rilascio netto è poi calcolato come prodotto del gradiente di concentrazione arterovenoso e del flusso plasmatico all'avambraccio. La concentrazione antigenica del t-PA è misurata invece usando tecniche di immunoassorbimento con legame enzimatico⁶⁵, e il rilascio netto è espresso come ng per 100 ml per minuto, mentre l'attività del t-PA è determinata fotometricamente ed espressa come UI per 100 mL per minuto⁶⁶. Diversi studi hanno evidenziato che non c'è rilascio dimostrabile di PAI-1 attraverso l'avambraccio, quindi, l'attività del t-PA aumenta in parallelo alla sua concentrazione antigenica⁶⁷. Non ci sono consensi unanimi però su quale valore sia più attendibile tra l'antigene del t-PA e la sua attività. Anche se è vero che solo il t-PA libero è funzionalmente attivo, ultimamente l'efficacia della fibrinolisi endogena viene determinata come entità di rilascio locale di t-PA e sua risultante attività a livello del sito di trombosi.

2.2.b) Regolazione del rilascio di t-PA.

Il ruolo dell'ossido nitrico (NO) nel processo di rilascio endoteliale di t-PA non è ad oggi ben chiaro. La sua secrezione indotta dalla sostanza P è inibita dall'N-monometil-L-arginina (L-NMMA), inibitore dell'NO sintetasi^{68,69}. Al contrario, il rilascio del t-PA indotto dalla bradichinina è risultato non modificato dall'L-NMMA in uno studio e incrementato in un altro. Lo shear stress è un noto stimolante per la secrezione di t-PA nelle cellule endoteliali in coltura⁷⁰. Nei vasi di conduzione dell'uomo ex vivo, lo shear stress stimola l'espressione del t-PA ed incrementa il suo pool intracellulare senza però stimolarne la secrezione⁷¹. In linea con tutto questo, un marcato incremento del flusso durante infusione di

vasodilatatori, come il nitroprussiato di sodio e la papaverina, non agiscono da stimolanti il rilascio di t-PA in vivo^{72,73}.

2.2.c) Rilevanza clinica del rilascio endoteliale di t-PA.

Ad oggi numerosi studi clinici hanno valutato la vasodilatazione endotelio dipendente come indice di funzione endoteliale ed hanno inequivocabilmente dimostrato che in presenza della maggior parte di fattori di rischio cardiovascolare, quali l'ipertensione arteriosa, si osserva una ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente conseguente ad una ridotta biodisponibilità di NO. Comunque dobbiamo considerare che tale vasodilatazione può non essere rappresentativa di altri aspetti importanti della funzione endoteliale, quali ad esempio la regolazione della fibrinolisi. Questo è un aspetto cruciale da analizzare poiché la formazione, progressione e risoluzione del trombo, insieme all'erosione o all'instabilità della placca coronarica, dipendono in modo critico dall'efficacia della fibrinolisi endogena. A tale riguardo l'endotelio contribuisce in modo importante alla difesa contro la trombosi intravascolare attraverso il rilascio acuto dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) e del suo principale inibitore, l'inibitore del fattore tissutale del plasminogeno (PAI1). In assenza di patologie in atto, nei vasi, l'attivazione della piastrine o della cascata coagulativa induce un rapido rilascio di t-PA dalle cellule endoteliali, che agisce da importante meccanismo controregolatore della coagulazione degradando la fibrina e prevenendo quindi l'estensione del trombo. Vista quindi l'indubbia importanza di tale sostanza nella fibrinolisi, valutando e quantificando la capacità di rilasciare il t-PA, si possono ottenere importanti informazioni sulla funzionalità endoteliale nell'aterotrombosi.

Misurazioni di t-PA rilasciato localmente sarebbero probabilmente di estremo interesse e rilevanza soprattutto nei vasi coronarici, ma poiché sarebbero eseguibili solo in soggetti candidati a coronarografia, è stato studiato in modo più approfondito il circolo dell'avambraccio, che ha lo svantaggio di essere meno suscettibile al processo aterosclerotico. Comunque i pochi studi sul distretto coronarico hanno dimostrato che una riduzione nell'attività del t-PA o nel suo rilascio sono associati con un'aumentata incidenza di eventi cardiaci maggiori in pazienti con angina stabile o instabile^{74,75}, perciò, è stato suggerito che la trombosi coronarica dipenda in modo critico dal bilancio locale del processo fibrinolitico⁷⁶. Riguardo al principale fattore omeostatico della funzione endoteliale, l'NO, mentre il suo ruolo nella regolazione del tono vascolare è ormai chiaramente dimostrato, i suoi effetti nel promuovere la fibrinolisi endogena mediante la regolazione del rilascio di t-PA sono meno chiari e solo scarsamente studiati, con risultati peraltro non conclusivi^{45,47}.

2.2.d) Concentrazioni plasmatiche basali di t-PA

Numerosi studi hanno investigato la relazione fra la concentrazione antigenica basale del t-PA nel distretto venoso e il conseguente rischio di malattia coronarica. In una meta-analisi di studi prospettici, il rischio di malattia coronarica è risultato di circa il 50% maggiore nei soggetti con concentrazioni antigeniche di t-PA nel plasma a titolo più alto rispetto a quelli con concentrazioni minori⁷⁷. Questa apparente contraddizione riflette il concomitante incremento delle concentrazioni di PAI-1 e l'associata riduzione dell'attività del t-PA. Comunque, considerando i risultati, i livelli basali plasmatici di t-PA non riflettono la

capacità locale di rilasciare tale fattore in acuto in risposta alla formazione del trombo⁶². Ne consegue che è molto probabilmente la valutazione del rilascio acuto di t-PA l'elemento di maggior rilevanza fisiopatologica.

SCOPO DELLA TESI

Il primo obiettivo del nostro studio è determinare se l'NO è direttamente coinvolto nella modulazione del rilascio locale di t-PA nel microcircolo dell'avambraccio di soggetti normotesi. Il secondo obiettivo è di valutare se la biodisponibilità di NO possa essere coinvolta nel ridotto rilascio locale di t-PA nel microcircolo di pazienti ipertesi essenziali, una condizione clinica in cui è ben documentata una alterata vasodilatazione endotelio-dipendente legata ad una ridotta disponibilità di NO. Riteniamo quest'ultimo un aspetto cruciale e con un importante impatto clinico, dal momento che il ripristino della biodisponibilità di NO potrebbe migliorare la fibrinolisi nell'ipertensione arteriosa.

CAPITOLO 3 MATERIALI e METODI

3.1) Selezione dei pazienti

La popolazione oggetto di studio comprende 34 uomini con ipertensione essenziale e 30 maschi volontari sani di età variabile. I

pazienti sono stati reclutati nei nostri ambulatori. I criteri di inclusione dei nostri pazienti sono stati: età compresa fra i trenta ed i sessantacinque anni, non fumatori, valori di pressione arteriosa clinica da seduti (dopo 10 minuti di riposo) compresi fra 140-90 e 160-99 mmHg, confermati in due distinte occasioni nell'arco di un mese e assenza di danno agli organi bersaglio in accordo alle linee guida europee. Su ogni paziente sono stati eseguiti anamnesi, esame obiettivo, ECG e analisi di laboratorio di routine. In nessuno sono stati riscontrati iperlipidemia, diabete, indice di massa corporea (BMI) >30 Kg/m², funzione renale alterata o altre malattie cardiovascolari associate all'ipertensione essenziale. Le forme secondarie di ipertensione sono state escluse con le indagini diagnostiche di routine. I pazienti, inoltre non dovevano assumere farmaci da almeno un mese prima dello studio. Il protocollo di studio è stato approvato dalla commissione etica ed eseguito in accordo alle linee guida del nostro istituto. Tutti i pazienti erano consapevoli della natura, dello scopo e dei potenziali rischi dello studio ed hanno firmato un consenso scritto.

3.2) Disegno dello studio.

3.2.a) PROCEDURA SPERIMENTALE: gli studi sono stati eseguiti nel microcircolo dell'avambraccio utilizzando come modello sperimentale l'avambraccio isolato e perfuso. Tutti gli studi sono stati eseguiti al mattino dopo una notte di digiuno, in una stanza a temperatura controllata. Nelle vene antecubitali profonde di entrambe le braccia (avambraccio sperimentale e controlaterale di controllo) è stato posizionato un agocannula per l'esecuzione di prelievi venosi.

Dopo somministrazione sottodermica di mepivacaina all'1%, è stata eseguita cannulazione dell'arteria brachiale del braccio sperimentale mediante un catetere di poliuretano da 20 gauge (BD Angiocath, Becton Dickinson Infusion Therapy System Inc. Sandy, Utah, USA) per la somministrazione intra-arteriosa di farmaci a concentrazione inefficace a livello sistemico e per il monitoraggio invasivo della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca. Dopo circa 30' di riposo, è stato misurato il flusso arterioso dell'avambraccio (FBF) ad entrambi gli avambracci mediante pletismografia strain gauge; questo dispositivo è stato collegato al pletismografo (EC-6, D.E. Hokanson Inc., Bellevue, WA, USA) e per ogni misurazione veniva insufflato a 40 mmHg un bracciale sistemato a livello del braccio, con un sistema rapido di gonfiaggio in modo tale da impedire il reflusso venoso dalle estremità^{25,78}.

3.2.b) DISEGNO SPERIMENTALE

Protocollo 1: effetti dell'acetilcolina sul flusso arterioso e sul rilascio locale di t-PA e PAI-1.

In 12 soggetti sani e in 16 pazienti ipertesi è stata stimata l'entità della vasodilatazione endotelio-dipendente attraverso una curva dose-risposta intrarteriosa di acetilcolina (0.45-1,5 µg/100mL/min). Abbiamo poi eseguito una curva dose-risposta al nitroprussiato di sodio, (0.5-1.0 µg/100 mL/min), un vasodilatatore endotelio-indipendente. Sono state scelte queste dosi di nitroprussiato in modo da indurre unavasodilazione comparabile a quella ottenuta con l'acetilcolina. Nitroprussiato di sodio e acetilcolina sono stati infusi in ordine random ed ogni dose è stata somministrata per 15 minuti. E' stato osservato un

intervallo di 30 minuti fra le varie infusioni di sostanze per ottenere un adeguato wash-out farmacologico.

Protocollo 2: effetti dell'inibizione della NOS sul rilascio stimolato di t-PA.

Per valutare gli effetti dell'NO sulla vasodilatazione e sul rilascio endoteliale di t-PA, abbiamo infuso acetilcolina, in 12 soggetti sani e in 12 pazienti ipertesi, prima in assenza e poi in presenza di infusione intrarteriosa di N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), un inibitore dell'ossido nitrico sintetasi (Clinalfa AG, Laufelfingen, Switzerland; 100 µg/100 mL/min). Poiché L-NMMA modifica il flusso di sangue, abbiamo valutato gli effetti dell'acetilcolina durante clampaggio dell'NO, permettendoci così di valutare gli effetti dell'agonista endoteliale in presenza di blocco della NOS senza modificazione del flusso basale ed evitando perciò ogni possibile alterazione sul bilancio netto del t-PA. Dopo 10 minuti di infusione di L-NMMA per poco tempo abbiamo co-infuso nitroprussiato di sodio a dosi corrette (0.3 e 0.4 µg/100 ml/min) per neutralizzare la vasocostrizione indotta da L-NMMA e ripristinare l'FBF basale.

Campionamenti di sangue e valutazioni biochimiche

Basalmente, i campioni di sangue venoso sono stati raccolti in provette con litio-eparina e EDTA e immediatamente immersi nel ghiaccio. Il plasma è stato immediatamente centrifugato e conservato a -70°C fino al momento dell'analisi. Il colesterolo sierico totale, i trigliceridi, il colesterolo HDL e la glicemia sono stati misurati con metodi di analisi enzimatica (Roche, Diagnostic, Mannheim, Germany). Il colesterolo

LDL è stato calcolato con l'equazione di Friedewalds. I simultanei prelievi di sangue arterioso e venoso dall'avambraccio sperimentale sono stati effettuati immediatamente prima della misurazione del FBF, in condizioni basali ed al termine di ogni dose di farmaco prevista. Tutti i campioni sono stati ottenuti eliminando i primi 4 mL di sangue e sistemando il resto in provette contenenti 1/9 vol di 0.45 mol/L di citrato di sodio come tampone centrifugate immediatamente 4°C e 3000 g per 15 minuti. Sono state poi determinate le concentrazioni degli antigeni del t-PA mediante tecnica di immunoassorbimento con legame enzimatico (ELISA, Tecnoclone GmbH, Vien, Austria). Tutti i campioni sono stati valutati con doppia prova sullo stessa piastra di analisi. I coefficienti di variazione fra le varie prove sullo stesso campione (intra-assay) e fra varie prove con altri campioni (inter-assay) sono risultati inferiori al 10%.

3.2.c) Analisi dei dati

Il flusso plasmatico dei dati è stato determinato utilizzando L'FBF e l'ematocrito. Il rilascio netto o l'entità dell'uptake di t-PA è stato calcolando seguendo la seguente formula :

$$\text{rilascio netto} = (C_v - C_a) * [\text{FBF} * (101 - \text{ematocrito}) / 100]$$

dove C_v e C_a sono rispettivamente le concentrazioni venosa e arteriosa. L'ammontare totale del t-PA rilasciato è stato calcolato utilizzando la formula dell'area sotto la curva per le misurazioni ripetute⁷⁹. I risultati riguardanti i parametri demografici e clinici dei pazienti, le concentrazioni venose ed arteriose, basali e dopo stimolo, di t-PA sono stati confrontati usando il test di Wilcoxon. Le risposte

all'acetilcolina e al nitroprussiato di sodio sono state analizzate utilizzando l'ANOVA a due vie o per misure ripetute. I risultati sono stati espressi come $\text{media} \pm \text{SEM}$, fatta eccezione per quelli mostrati nella tabella 1 ($\text{media} \pm \text{DS}$). I risultati finali sono stati considerati significativi per $p < 0.05$. Il computo per il potere del calcolo e per i metodi statistici sono è stato eseguito con l'uso del sistema SAS.

3.2.d) Farmaci

Acetilcolina Hcl (Farmigea SpA), L-NMMA (Clinalfa AG) e nitroprussiato di sodio (Malesci SpA) sono stati diluiti alla concentrazione desiderata mediante aggiunta di soluzione fisiologica. Il nitroprussiato di sodio è stato invece diluito in soluzione glucosata al 5% e protetto da fonti luminose con un foglio di alluminio.

CAPITOLO 4 RISULTATI

Nella pagina successiva (tabella 1) vengono mostrati i parametri clinici e i relativi valori di laboratorio ottenuti dagli esami eseguiti nella popolazione oggetto di studio.

Tabella 1. Caratteristiche cliniche del gruppo di studio

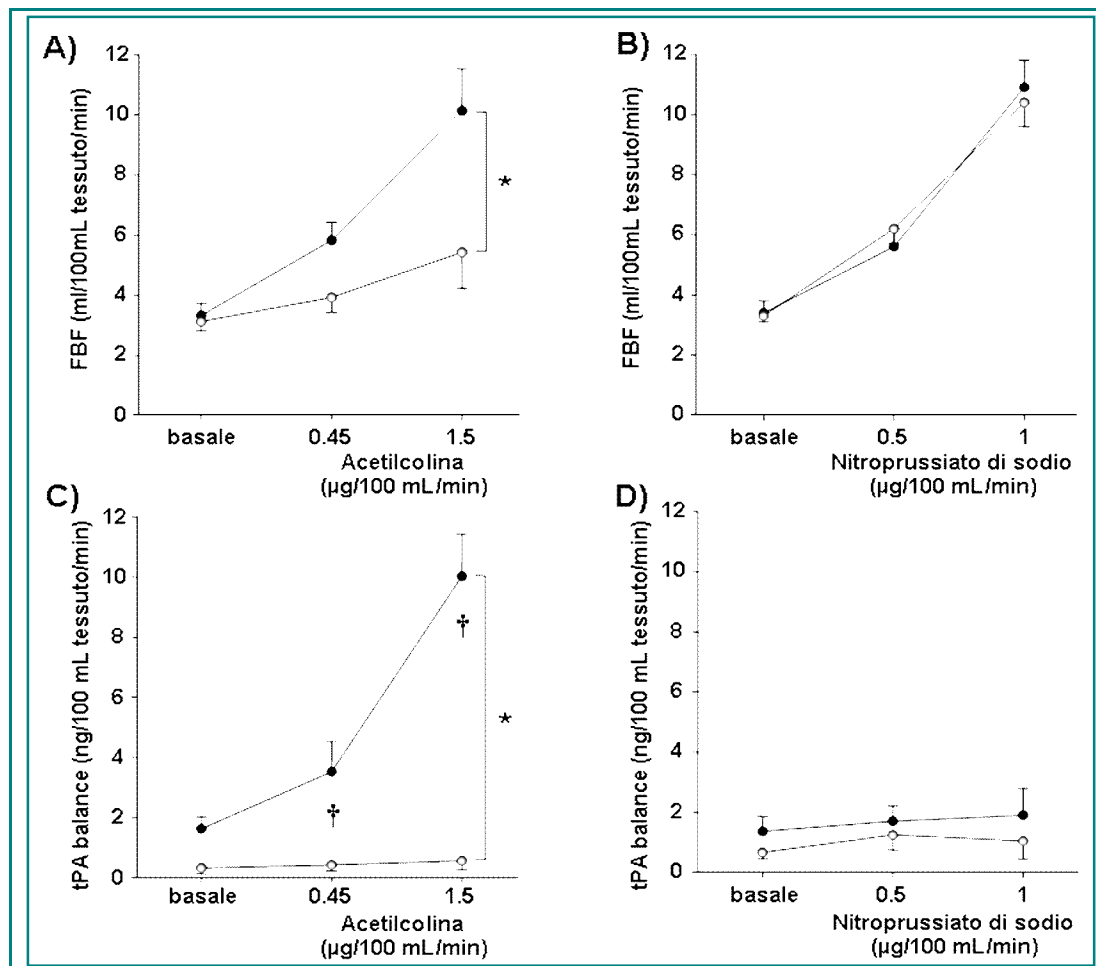
Parametri	Soggetti normotesi (n=30)	Pazienti ipertesi (n=34)
Età (anni)	44±7	48±10
Genere (uomo/donna)	30/0	34/0
Fumatore (SI/NO)	No	No
SBP (mmHg)	129±8	156±11*
DBP (mmHg)	81±6	95±4*
BMI (Kg/m ²)	25.4±2.4	26.2±3.4
Colesterolo totale (mg/dl)	210±34	194±37†
Colesterolo HDL (mg/dl)	46±14	49±13
Colesterolo LDL (mg/dl)	123±28	118±21
Glicemia plasmatica (mg/dl)	90±10	87±12
Omocisteinemia plasmatica (μmol/l)	10.3±4.4	9.5±7.9
Folati plasmatici (ng/ml)	6.7±3.4	6.5±2.4
Vitamina B ₁₂ (pg/ml)	311.5±124.9	470.5±354.5
PCR (mg/l)	4.4±3.3	4.6±3.6

*I dati sono presentati come valore medio ± SD o numero di soggetti. SBP: pressione sanguigna sistolica; DBP: pressione sanguigna diastolica; BMI: indice di massa corporea; HDL: lipoproteine ad alta densità; LDL: lipoproteine a bassa densità; PCR: proteina C reattiva. *p<0.0001 vs.soggetti normotesi; † p<0.05 vs.soggetti normotesi.*

Protocollo 1: effetti dell'acetilcolina sul flusso arterioso e sul rilascio locale di t-PA e di PAI-1

Effetti sull'FBF: la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina era significativamente ridotta ($p<0.001$) nei pazienti ipertesi rispetto ai controlli (Figura 4). Al contrario, la risposta vascolare al nitroprussiato di sodio era simile nei due gruppi (Figura 4).

Figura 4.

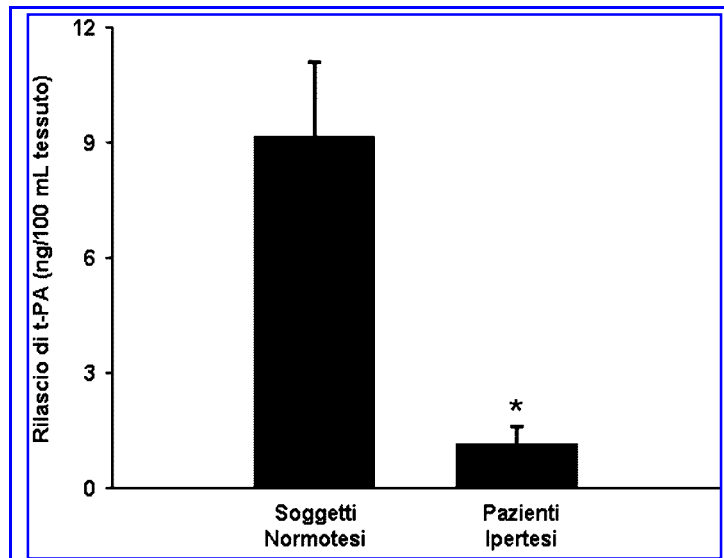


Incremento dell'FBF indotto dall'acetilcolina (A) e dal nitroprussiato di sodio (B) in soggetti normotesi e (cerchi neri) in pazienti ipertesi (cerchi bianchi). Effetti sul bilancio del t-PA in seguito ad infusione di acetilcolina (C) e nitroprussiato di sodio (D) in individui normotesi (cerchi neri) e in pazienti ipertesi (cerchi bianchi). I dati sono mostrati come valori medi SEM. * $p<0.05$; † $p<0.01$ vs linea di base.

Inoltre, sia nei soggetti normotesi che nei pazienti ipertesi, l'FBF misurato nel braccio controlaterale non mostrava variazioni per tutta la durata dello studio (dati non riportati).

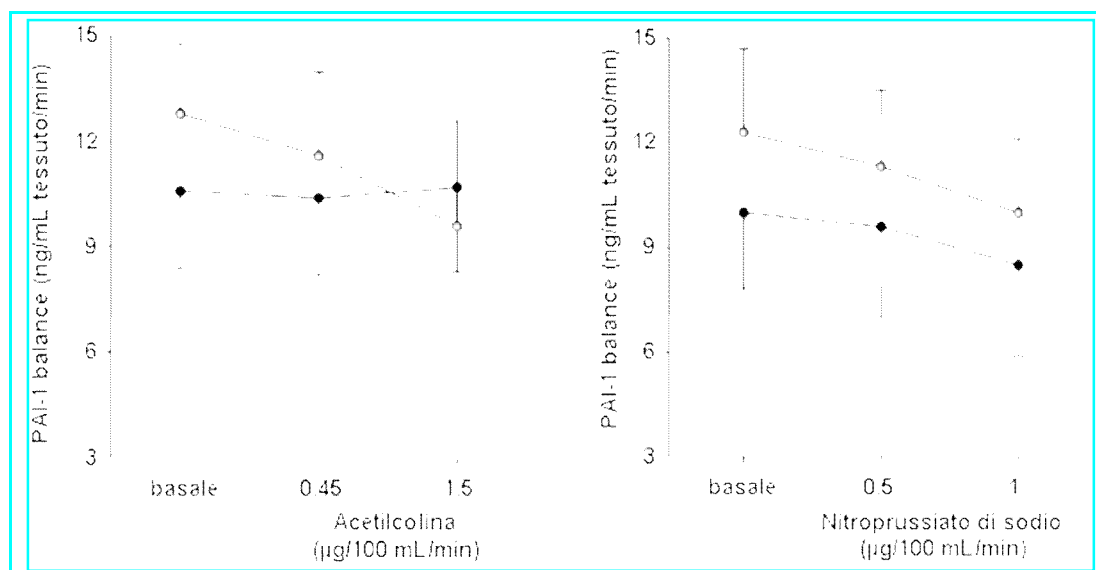
Effetti su t-PA e PAI-1: In condizioni basali, le concentrazioni dell'antigene del t-PA si sono rivelate più basse nei pazienti ipertesi che nei soggetti normotesi (dati non riportati), con un differenziale artero-venoso minore fra i pazienti ipertesi rispetto ai controlli. Di conseguenza, il rilascio basale di t-PA misurato all'avambraccio era significativamente ridotto negli ipertesi se confrontato con i soggetti normotesi (Figura 4; $p < 0.01$). Nei soggetti normotesi, l'infusione di acetilcolina induceva un progressivo aumento della concentrazione venosa dell'antigene del t-PA, un effetto non osservato nei pazienti ipertesi. Poiché la concentrazione arteriosa dell'antigene del t-PA non si modificava durante l'infusione di acetilcolina in entrambi i gruppi, il gradiente di concentrazione artero-venoso di t-PA risultava significativamente aumentato nei soggetti normotesi ma non nei soggetti ipertesi (Figura 5). Durante l'infusione di nitroprussiato di sodio non si osservava alcuna differenza nelle concentrazioni artero-venose in entrambi i gruppi. In conseguenza di tutto ciò, mentre nei soggetti normotesi l'infusione di acetilcolina ha determinato un incremento significativo dose-dipendente di rilascio di t-PA, ciò non è avvenuto nei pazienti ipertesi. Le concentrazioni arteriose e venose dell'antigene del PAI-1 in condizioni basali è risultato simile nei normotesi e negli ipertesi e non sono state osservate differenze rilevanti nel gradiente artero-venoso e nelle concentrazioni arteriose e venose dopo l'infusione di acetilcolina e di nitroprussiato di sodio in entrambi i gruppi.

Figura 5: ammontare del rilascio di t-PA in risposta all'acetilcolina.



Quantità di t-PA secreto (misurata come area sotto la curva) durante infusione di acetilcolina in soggetti normotesi e in pazienti con ipertensione essenziale. I dati sono espressi come valore medio \pm SEM. * $p < 0.001$ vs controlli normotesi.

Figure 6. Bilancio del PAI-1 durante infusione di acetilcolina e nitroprussiato di sodio.



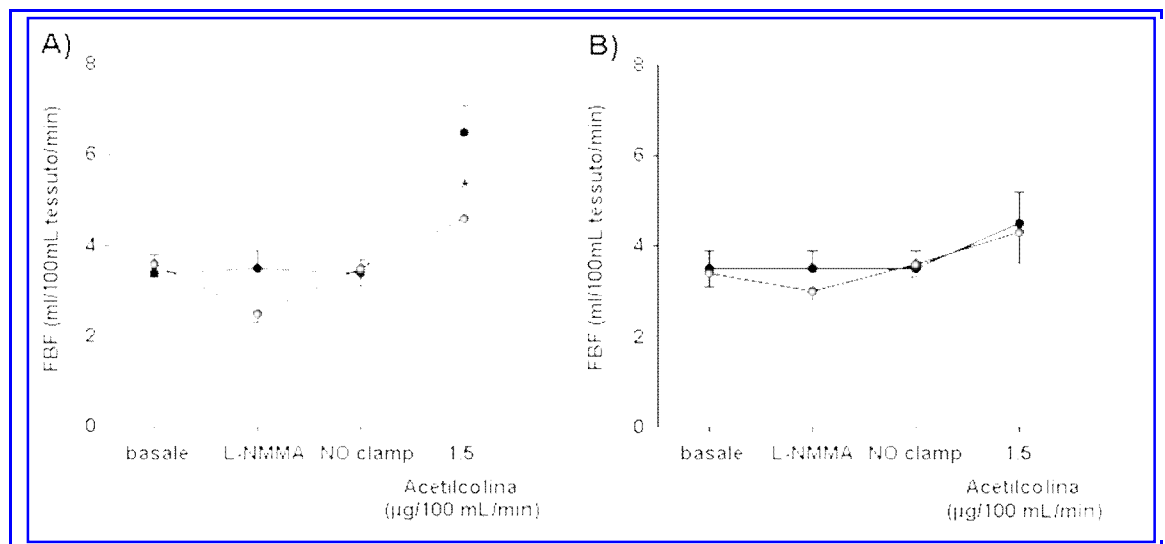
Effetti dell'acetilcolina e del nitroprussiato di sodio sul bilancio del PAI-1 in soggetti normotesi (cerchi neri) e in pazienti ipertesi (cerchi bianchi). I dati sono espresso come valore medio \pm SEM.

Nessuna variazione significativa risulta nel bilancio dell'antigene del PAI-1 dopo infusione di acetilcolina e nitroprussiato di sodio nel gruppo dei normotesi e dei pazienti ipertesi (Figura 6). Le concentrazioni arteriose e venose dei componenti maggiori della fibrinolisi nel braccio contro laterale non si sono modificate nel corso dello studio nei soggetti di entrambi i gruppi (dati non mostrati).

Protocollo 2: effetti dell'inibizione dell'ossido nitrico sintetasi (NOS) sul rilascio di t-PA sotto stimolo

Nei soggetti normotesi, l'infusione di L-NMMA riduceva significativamente la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina (Figura 7). Al contrario, nei pazienti ipertesi la vasodilatazione indotta dall'agonista muscarinico non veniva modificata dalla simultanea infusione di L-NMMA. (Figura 7). Nei soggetti di entrambi i gruppi, l'FBF controlaterale non ha subito variazioni nel corso delle misurazioni (dati non mostrati).

Figura 7. Vasodilatazione indotta dall'Ach in assenza e in presenza di inibizione della NOS.

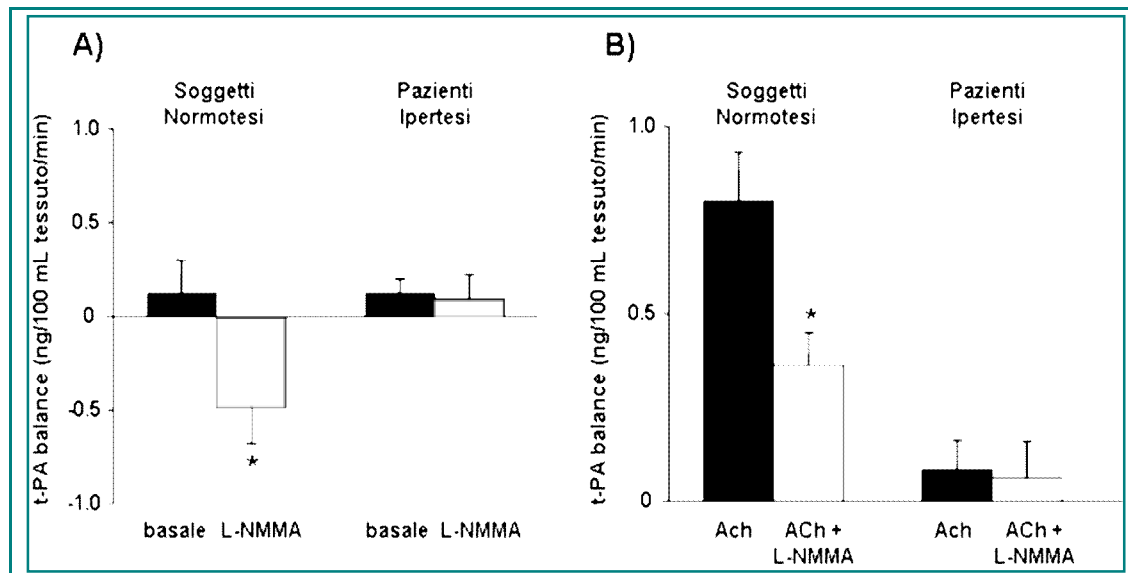


*Incremento dell'FBF indotto dall'acetilcolina durante infusione di soluzione salina (cerchi neri) o L- NMMA (cerchi bianchi) in soggetti normotesi (A) e pazienti ipertesi (B). *p<0.05 vs soluzione salina.*

Rilascio dei componenti della fibrinolisi

Negli individui normotesi l'infusione di L-NMMA riduceva il rilascio basale di t-PA (Figura 8). Inoltre, in presenza di L-NMMA, si è verificata una riduzione di rilascio di t-PA seguente all'infusione di acetilcolina (Figura 8). Al contrario, nei pazienti ipertesi, non si era osservato nessun cambiamento nel rilascio di t-PA al termine della sola infusione di L-NMMA (Figura 8) così come durante l'infusione di acetilcolina e L-NMMA (Figura 8). Sia nei soggetti normotesi che nei pazienti ipertesi, le concentrazioni arteriosa e venosa dell'antigene del t-PA nell'arto contro laterale non si sono modificate durante lo studio (dati non mostrati).

Figura 8. Bilancio del t-PA tonico e stimolato in assenza e in presenza di inibizione della NOS.



A) Bilancio tonico del t-PA prima (colonne nere) e dopo (colonne bianche) infusione di L-NMMA in soggetti normotesi e in pazienti ipertesi. * $p < 0.05$ vs linea base..

B) Bilancio stimolato di t-PA dopo Ach da sola (colonne nere) o in presenza (colonne bianche) di L-NMMA in soggetti normotesi e in pazienti con ipertensione essenziale (destra). I dati sono espressi come valore medio \pm SEM. * $p < 0.05$ vs Ach da solo..

CAPITOLO 5 DISCUSSIONE

Nel nostro studio abbiamo osservato che l'infusione intra-arteriosa di acetilcolina, un agonista endotelio-dipendente, induce un rilascio immediato di t-PA nel microcircolo dell'avambraccio di soggetti sani. Abbiamo inoltre osservato che l'infusione di nitroprussiato di sodio, un vasodilatatore endotelio-indipendente, pur determinando una vasodilatazione di entità simile a quella ottenuta con l'acetilcolina, non ha alcun effetto sul rilascio di t-PA, un dato che dimostra che il rilascio di questo componente della fibrinolisi è specificatamente legato allo stimolo delle cellule endoteliali^{67,80} ed è indipendente dall'incremento di flusso arterioso. La novità principale dei risultati del nostro studio riguarda la dimostrazione nell'uomo che l'NO rilasciato dalle cellule endoteliali svolge un ruolo primario nella modulazione del rilascio di t-PA. Per valutare la disponibilità di NO abbiamo utilizzato l'inibitore dell'NO-sintetasi, L-NMMA. Nei soggetti normotesi, l'infusione di L-NMMA determina una riduzione nella concentrazione venosa di t-PA. Poiché l'FBF non si modifica in virtù dell'utilizzo della tecnica dell'NO-clamp, questo risultato indica un ridotto rilascio basale di t-PA nel letto vascolare dell'avambraccio, come diretta conseguenza del blocco dell'enzima che catalizza il rilascio di NO. Inoltre, la L-NMMA, che riduce l'effetto vasodilatante dell'acetilcolina, a dimostrazione di una conservata biodisponibilità di NO in condizioni fisiologiche, riduce significativamente il rilascio di t-PA indotto dall'acetilcolina nel circolo dell'avambraccio. Complessivamente, questi risultati indicano che nei soggetti sani esiste un effetto di modulazione positiva da parte dell'NO

sul rilascio di t-PA, sia basale che sotto stimolo di un agonista endoteliale. Al contrario, nei pazienti con ipertensione essenziale, la vasocostrizione indotta da L-NMMA è risultata significativamente ridotta rispetto ai controlli, confermando il ridotto rilascio basale di NO¹⁶. In questi pazienti il rilascio tonico di t-PA è stato quasi abolito e di conseguenza non è stato possibile valutare una eventuale ulteriore riduzione nella sua secrezione indotta dall'infusione di L-NMMA. Inoltre, nei pazienti ipertesi la diminuita risposta vascolare all'acetilcolina è risultata totalmente resistente all'L-NMMA, a conferma di una pressoché assente biodisponibilità di NO in questi pazienti. Inoltre, non è stata osservata nessuna modificazione sul rilascio di t-PA indotta dall'acetilcolina sotto simultanea infusione di L-NMMA. Questi dati confermano e rafforzano la nostra ipotesi dimostrata nei soggetti normotesi e cioè che esiste una forte correlazione fra NO e rilascio dell'attivatore tissutale del plasminogeno. In verità, in qualsiasi condizione clinica caratterizzata da una ridotta disponibilità di NO, come si ha nell'ipertensione essenziale, si riscontra un'attenuazione delle proprietà fibrinolitiche delle cellule endoteliali. I nostri risultati sono in linea con quanto osservato in precedenza nei modelli animali^{81,82}. Nell'uomo, queste ipotesi erano state precedentemente valutate, ma con risultati contrastanti. Infatti, in accordo con i nostri risultati, Newby et al⁵⁹ avevano descritto nel microcircolo dell'avambraccio di soggetti sani un diminuito rilascio di t-PA indotto dalla sostanza P in presenza di L-NMMA. Al contrario, in un altro era stato riportato un aumentato rilascio di t-PA indotto dalla bradichinina in presenza di L-NMMA⁸³. Questi risultati contrastanti potrebbero essere determinati dalle alte dosi di L-NMMA usate nell'ultimo studio (5 mg/mn) in confronto a quelle usate nel nostro studio ed in quello condotto da

Newby ($4\mu\text{mol}/\text{min}\approx 1\text{mg}/\text{min}$). Poiché il calcolo del bilancio netto di t-PA varia in funzione del flusso plasmatico, è molto probabile che una perturbazione maggiore del flusso secondario ad alte dosi di L-NMMA possa essere responsabile di un incrementato rilascio di t-PA in questi pazienti⁶⁹. Dobbiamo anche considerare, che in condizioni sperimentali, l'utilizzo della tecnica dell'NO-clamp, che ripristina l'FBF basale dopo la vasocostrizione indotta da L-NMMA, ovvia a questo limite metodologico.

CONCLUSIONI

I risultati del presente studio dimostrano che sia il rilascio basale che quello indotto dall'agonista di NO sono direttamente coinvolti nel rilascio di t-PA dalle cellule endoteliali. L'ipertensione essenziale, caratterizzata da una riduzione nella disponibilità basale e sotto stimolo di NO, è anche associata ad una alterata capacità di rilascio di t-PA, suggerendo un ruolo maggiore nella ridotta disponibilità di NO nel determinare un peggioramento sia nella vasodilatazione che nel rilascio endoteliale di t-PA. Considerando che NO gioca un ruolo determinante nella modulazione del tono vascolare e della proprietà fibrinolitiche, è immaginabile che entrambe queste funzioni possano contribuire al rischio degli eventi aterotrombotici nei pazienti con ipertensione essenziale³⁶. La definizione di ulteriori aspetti in grado di agire sulla disfunzione endoteliale aumenta le conoscenze della fisiopatologia dell'aterotrombosi e fornisce ulteriori informazioni per lo sviluppo di specifiche strategie nel trattamento dell'ipertensione essenziale.

BIBLIOGRAFIA

1. Luscher TF aVP. *The endothelium: modulator of cardiovascular function*. Boca Raton: CRC Press; 1990.
2. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
3. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
4. Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983;53:557-573.
5. Moncada S. The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992;145:201-227.
6. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983;306:174-176.
7. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987;92:639-646.
8. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;2:1057-1058.
9. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and

- proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83:1774-1777.
10. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4651-4655.
 11. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60-68.
 12. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3375-3378.
 13. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339:572-575.
 14. Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* 1988;12:530-548.
 15. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990;323:27-36.
 16. Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Buralli S, Salvetti A. Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients. *Circulation* 1999;100:1400-1405.

17. Taddei S, Versari D, Cipriano A, Ghiadoni L, Galetta F, Franzoni F, Magagna A, Viridis A, Salvetti A. Identification of a cytochrome P450 2C9-derived endothelium-derived hyperpolarizing factor in essential hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:508-515.
18. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-456.
19. Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2000;2:98-105.
20. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension* 1997;29:274-279.
21. Viridis A, Ghiadoni L, Versari D, Giannarelli C, Salvetti A, Taddei S. Endothelial function assessment in complicated hypertension. *Curr Pharm Des* 2008;14:1761-1770.
22. Taddei S, Salvetti A. Endothelial dysfunction in essential hypertension: clinical implications. *J Hypertens* 2002;20:1671-1674.
23. Taddei S, Pedrinelli R, Salvetti A. Sympathetic nervous system-dependent vasoconstriction in humans. Evidence for mechanistic role of endogenous purine compounds. *Circulation* 1990;82:2061-2067.
24. Taddei S, Mattei P, Viridis A, Sudano I, Ghiadoni L, Salvetti A. Forearm vasodilation in response to acetylcholine is increased by

- potassium in essential hypertensive patients. *J Hypertens Suppl* 1993;11 Suppl 5:S144-145.
25. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 1998;97:2222-2229.
 26. Giannarelli C, Virdis A, De Negri F, Duranti E, Magagna A, Ghiadoni L, Salvetti A, Taddei S. Tissue-type plasminogen activator release in healthy subjects and hypertensive patients: relationship with beta-adrenergic receptors and the nitric oxide pathway. *Hypertension* 2008;52:314-321.
 27. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlaeger H, Saubier B, Just H. Coronary vasomotion in response to sympathetic stimulation in humans: importance of the functional integrity of the endothelium. *J Am Coll Cardiol* 1989;14:1181-1190.
 28. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989;2:997-1000.
 29. Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* 2005;144:449-458.
 30. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990;323:22-27.

31. Taddei S, Mattei P, Viridis A, Sudano I, Ghiadoni L, Salvetti A. Effect of potassium on vasodilation to acetylcholine in essential hypertension. *Hypertension* 1994;23:485-490.
32. Viridis A, Ghiadoni L, Cardinal H, Favilla S, Duranti P, Birindelli R, Magagna A, Bernini G, Salvetti G, Taddei S, Salvetti A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting hyperhomocystinemia in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1106-1115.
33. Touyz RM. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2003;1:91-106.
34. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. *Drugs* 2002;62:265-284.
35. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 1997;20:II-3-10.
36. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 2005;111:363-368.
37. Ghiadoni L, Taddei S, Viridis A, Sudano I, Di Legge V, Meola M, Di Venanzio L, Salvetti A. Endothelial function and common carotid artery wall thickening in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:25-32.
38. Zeiher AM, Schachlinger V, Hohnloser SH, Saurbier B, Just H. Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans. Elevated high-density lipoprotein levels ameliorate

- abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. *Circulation* 1994;89:2525-2532.
39. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000;101:948-954.
 40. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101:1899-1906.
 41. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:2673-2678.
 42. Pearson JD. Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999;12:329-341.
 43. Oliver JJ, Webb DJ, Newby DE. Stimulated tissue plasminogen activator release as a marker of endothelial function in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2470-2479.
 44. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroroberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001;104:191-196.
 45. Emeis JJ. Regulation of the acute release of tissue-type plasminogen activator from the endothelium by coagulation activation products. *Ann N Y Acad Sci* 1992;667:249-258.

46. Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* 1982;257:2912-2919.
47. Plow EF, Felez J, Miles LA. Cellular regulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1991;66:32-36.
48. Nordenhem A, Wiman B. Tissue plasminogen activator (tPA) antigen in plasma: correlation with different tPA/inhibitor complexes. *Scand J Clin Lab Invest* 1998;58:475-483.
49. Narita M, Bu G, Herz J, Schwartz AL. Two receptor systems are involved in the plasma clearance of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo. *J Clin Invest* 1995;96:1164-1168.
50. Ehrlich HJ, Gebbink RK, Keijer J, Linders M, Preissner KT, Pannekoek H. Alteration of serpin specificity by a protein cofactor. Vitronectin endows plasminogen activator inhibitor 1 with thrombin inhibitory properties. *J Biol Chem* 1990;265:13029-13035.
51. Fox KA, Robison AK, Knabb RM, Rosamond TL, Sobel BE, Bergmann SR. Prevention of coronary thrombosis with subthrombolytic doses of tissue-type plasminogen activator. *Circulation* 1985;72:1346-1354.
52. van den Eijnden-Schrauwen Y, Kooistra T, de Vries RE, Emeis JJ. Studies on the acute release of tissue-type plasminogen activator from human endothelial cells in vitro and in rats in vivo: evidence for a dynamic storage pool. *Blood* 1995;85:3510-3517.
53. Huber D, Cramer EM, Kaufmann JE, Meda P, Masse JM, Kruithof EK, Vischer UM. Tissue-type plasminogen activator (t-PA)

is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both in vitro and in vivo. *Blood* 2002;99:3637-3645.

54. Emeis JJ, van den Eijnden-Schrauwen Y, van den Hoogen CM, de Priester W, Westmuckett A, Lupu F. An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator. *J Cell Biol* 1997;139:245-256.
55. Jern C, Selin L, Tengborn L, Jern S. Sympathoadrenal activation and muscarinic receptor stimulation induce acute release of tissue-type plasminogen activator but not von Willebrand factor across the human forearm. *Thromb Haemost* 1997;78:887-891.
56. Coulet F, Blons H, Cabelguenne A, Lecomte T, Lacourreye O, Brasnu D, Beaune P, Zucman J, Laurent-Puig P. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res* 2000;60:707-711.
57. Knop M, Gerke V. Ca²⁺ -regulated secretion of tissue-type plasminogen activator and von Willebrand factor in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1600:162-167.
58. Wall U, Jern C, Jern S. High capacity for tissue-type plasminogen activator release from vascular endothelium in vivo. *J Hypertens* 1997;15:1641-1647.
59. Newby DE, Wright RA, Dawson P, Ludlam CA, Boon NA, Fox KA, Webb DJ. The L-arginine/nitric oxide pathway contributes to the acute release of tissue plasminogen activator in vivo in man. *Cardiovasc Res* 1998;38:485-492.

60. Allen RA, Kluft C, Brommer EJ. Effect of chronic smoking on fibrinolysis. *Arteriosclerosis* 1985;5:443-450.
61. Brown NJ, Nadeau JH, Vaughan DE. Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin. *Thromb Haemost* 1997;77:522-525.
62. Hrafnkelsdottir T, Gudnason T, Wall U, Jern C, Jern S. Regulation of local availability of active tissue-type plasminogen activator in vivo in man. *J Thromb Haemost* 2004;2:1960-1968.
63. Brown NJ, Gainer JV, Stein CM, Vaughan DE. Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release in human vasculature. *Hypertension* 1999;33:1431-1435.
64. Jern C, Selin L, Jern S. In vivo release of tissue-type plasminogen activator across the human forearm during mental stress. *Thromb Haemost* 1994;72:285-291.
65. Declerck PJ, Alessi MC, Verstreken M, Kruithof EK, Juhan-Vague I, Collen D. Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 1988;71:220-225.
66. Wiman B, Lindahl T, Almqvist A. Evidence for a discrete binding protein of plasminogen activator inhibitor in plasma. *Thromb Haemost* 1988;59:392-395.
67. Jern S, Selin L, Bergbrant A, Jern C. Release of tissue-type plasminogen activator in response to muscarinic receptor stimulation in human forearm. *Thromb Haemost* 1994;72:588-594.

68. Brown NJ, Gainer JV, Murphey LJ, Vaughan DE. Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B(2) receptor-dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway. *Circulation* 2000;102:2190-2196.
69. Smith DT, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, DeSouza CA. Endothelial release of tissue-type plasminogen activator in the human forearm: role of nitric oxide. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;42:311-314.
70. Diamond SL, Sharefkin JB, Dieffenbach C, Frasier-Scott K, McIntire LV, Eskin SG. Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. *J Cell Physiol* 1990;143:364-371.
71. Sjogren LS, Gan L, Doroudi R, Jern C, Jungersten L, Jern S. Fluid shear stress increases the intra-cellular storage pool of tissue-type plasminogen activator in intact human conduit vessels. *Thromb Haemost* 2000;84:291-298.
72. Matsumoto T, Minai K, Horie H, Ohira N, Takashima H, Tarutani Y, Yasuda Y, Ozawa T, Matsuo S, Kinoshita M, Horie M. Angiotensin-converting enzyme inhibition but not angiotensin II type 1 receptor antagonism augments coronary release of tissue plasminogen activator in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1373-1379.
73. Minai K, Matsumoto T, Horie H, Ohira N, Takashima H, Yokohama H, Kinoshita M. Bradykinin stimulates the release of

tissue plasminogen activator in human coronary circulation: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1565-1570.

74. Held C, Hjemdahl P, Rehnqvist N, Wallen NH, Bjorkander I, Eriksson SV, Forslund L, Wiman B. Fibrinolytic variables and cardiovascular prognosis in patients with stable angina pectoris treated with verapamil or metoprolol. Results from the Angina Prognosis study in Stockholm. *Circulation* 1997;95:2380-2386.
75. Hoffmeister HM, Jur M, Ruf-Lehmann M, Helber U, Heller W, Seipel L. Endothelial tissue-type plasminogen activator release in coronary heart disease: Transient reduction in endothelial fibrinolytic reserve in patients with unstable angina pectoris or acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:547-551.
76. Rosenberg RD, Aird WC. Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states. *N Engl J Med* 1999;340:1555-1564.
77. Lowe GD, Danesh J, Lewington S, Walker M, Lennon L, Thomson A, Rumley A, Whincup PH. Tissue plasminogen activator antigen and coronary heart disease. Prospective study and meta-analysis. *Eur Heart J* 2004;25:252-259.
78. Viridis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, Buralli S, Taddei S, Salvetti A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation* 2000;101:2258-2263.

79. Pruessner JC, Kirschbaum C, Meinlschmid G, Hellhammer DH. Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinology* 2003;28:916-931.
80. Stein CM, Brown N, Vaughan DE, Lang CC, Wood AJ. Regulation of local tissue-type plasminogen activator release by endothelium-dependent and endothelium-independent agonists in human vasculature. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:117-122.
81. Klocking HP. Release of plasminogen activator by acetylcholine from the isolated perfused pig ear. *Thromb Res* 1979;16:261-264.
82. Emeis JJ. Perfused rat hindlegs. A model to study plasminogen activator release. *Thromb Res* 1983;30:195-203.
83. Rosenbaum DA, Pretorius M, Gainer JV, Byrne D, Murphey LJ, Painter CA, Vaughan DE, Brown NJ. Ethnicity affects vasodilation, but not endothelial tissue plasminogen activator release, in response to bradykinin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1023-1028.